

Bi-Fluorophor-markierte Sonden zum Nachweis von Nukleinsäuren

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft 5'-3'-Bi-Fluorophor-markierte Sonden zum Nachweis von Analyten, insbesondere von Nukleinsäuren, insbesondere für die konfokale Fluoreszenzspektroskopie.

10 Der Nachweis von Nukleinsäuremolekülen in einer Probe erfolgt üblicherweise durch Hybridisierung unter Verwendung von spezifischen Sonden. Eine Möglichkeit zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung der Hybridisierungsprodukte besteht darin, die Sonden mit Fluoreszenz-Farbstoffgruppen zu markieren, wobei die Markierungsgruppen in der Regel
15 an das 5'-Ende der Nachweissonde gebunden werden. Nach Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge emittieren die Fluoreszenz-Markierungsgruppen Photonen, die mittels geeigneter Detektionsmethoden nachgewiesen werden können. Das Auftreten einer Fluoreszenz-Markierung korreliert mit dem Vorhandensein der nachzuweisenden Nukleinsäure in der
20 Probe. Durch Verwendung geeigneter Methoden können auch Anzahl und Größe der Hybridisierungsprodukte bestimmt werden.

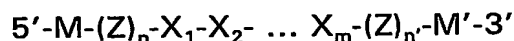
Die Anzahl der von den markierten Sonden emittierten Photonen hat einen erheblichen Einfluss auf die Sensitivität des Nachweisverfahrens. Während
25 mit roten Fluoreszenz-Markierungsgruppen markierte Sonden in vielen Fällen eine ausreichende Sensitivität [ausgedrückt in IPM (Impulse pro Molekül)] aufweisen, ist die Quantenausbeute bestimmter Fluoreszenzfarbstoffe im grünen Bereich aufgrund von Elektronentransfervorgängen zwischen Nukleobasen und der
30 Markierungsgruppe verringert. Um diese Wechselwirkungen zu vermindern, wurden Spacermoleküle, z.B. Hexaethylenglycol-Moleküle, zwischen der Sondensequenz und den Markierungsgruppen angebracht, die zu einer

- 2 -

geringfügigen, aber für viele Anwendungen nicht ausreichenden Verbesserung führen.

5 Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand darin, die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und insbesondere Sonden zum Nachweis von Analyten, z.B. von Nukleinsäuren mit verbesserter Sensitivität bereitzustellen.

10 Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Sonde der allgemeinen Strukturformel (I)



15 worin X_1 , X_2 ... und X_m jeweils für ein beliebiges Nukleotid oder Nukleotidanalogen stehen und worin die Sequenz $X_1-X_2- \dots X_m$ für eine mit einem Analyten bindefähige Sondensequenz steht, Z jeweils unabhängig für ein Pyrimidin-Nukleotid oder -Nukleotidanalogen steht,

20 M und M' Fluoreszenzmarkierungsgruppen darstellen, n und n' jeweils unabhängig ganze Zahlen von 1 bis 15 darstellen und m eine ganze Zahl entsprechend der Länge der Sondensequenz darstellt.

Die erfindungsgemäßen Nachweissonden enthalten neben der Fluoreszenz-Markierungsgruppe am 5'-Ende eine zweite Markierungsgruppe am 3'-Ende.
25 Diese beiden Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle sind von der mit der Zielnukleinsäure hybridisierenden Sondensequenz durch Oligo-Pyrimidin-Sequenzen als Spacer getrennt. Die IPM-Werte der erfindungsgemäßen Sonden sind bis zu 10 mal höher als diejenigen der aus dem Stand der Technik bekannten Sonden.

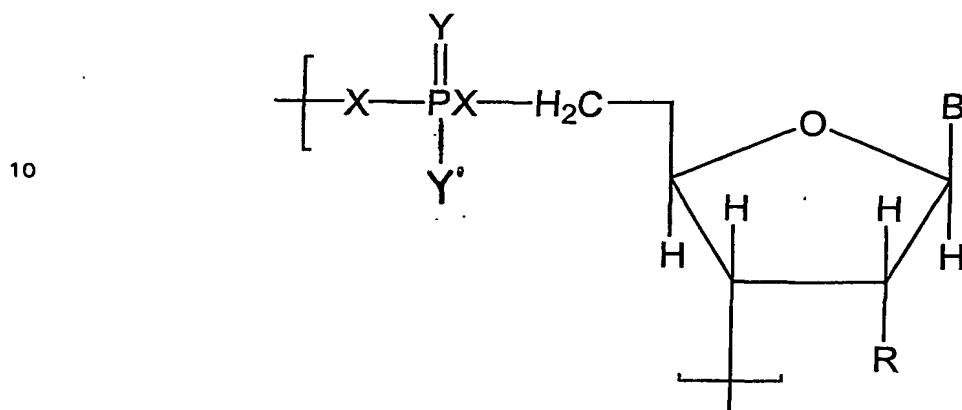
30

Die erfindungsgemäßen Sonden können aus Nukleotid- und Nukleotidanalogen-Bausteinen wie aus dem Stand der Technik bekannt,

- 3 -

z.B. PNA- oder LNA-Bausteinen, aufgebaut sein. Vorzugsweise sind die mit dem Analyten bindefähige Sondensequenz bildenden Einheiten X_1 , X_2 ... und X_m jeweils unabhängig ausgewählt aus Einheiten der allgemeinen Strukturformel (II) oder Salzen davon

5



15

worin

- B eine natürliche oder nicht-natürliche Nukleobase darstellt,
- R einen Rest, ausgewählt aus H, OH, Halogen, -CN, -C₁-C₆-Alkyl, -C₂-C₆-Alkenyl, -C₂-C₆-Alkynyl, -O-C₁-C₆-Alkyl, -O-C₂-C₆-Alkenyl, -O-C₂-C₆-Alkynyl, -SH, -S-C₁-C₆-Alkyl, -NH₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl) und -N(C₁-C₆-Alkyl)₂, darstellt,
- X jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus -O-, -S-, -NR'- und CR'₂ darstellt,
- Y jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus =O und =S, darstellt und
- Y' jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus -OR', -SR', -(NR')₂ und -CH(R')₂ darstellt,
- wobei R' jeweils unabhängig für H oder C₁-C₃-Alkyl steht.

30

- 4 -

Die Nukleobase B kann eine natürliche Nukleobase, z.B. Adenin, Cytosin, Uracil, Guanin oder Thymin, oder eine nicht-natürliche Nukleobase, z.B. 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, ein 5-modifiziertes Thymin- oder Cytosin-Derivat oder Isoguanin (6-Amino-2-hydroxy-purin),
5 sein.

Der Substituent R an der 2'-Position ist vorzugsweise H, so dass die Einheiten X_1 , X_2 ... und X_m zumindest teilweise 2'-Desoxynukleotide sind. Andere bevorzugte Bedeutungen für R sind Alkyl, Alkoxy, Alkenyl und
10 Halogen.

Die Einheiten der erfindungsgemäßen Sonde sind durch Phosphodiestergruppen oder modifizierte Phosphodiestergruppen verknüpft, worin bei den Einheiten der Strukturformel (II) X vorzugsweise jeweils
15 unabhängig -O-, -S- oder -NH- darstellt, Y vorzugsweise jeweils unabhängig =O oder =S darstellt und Y' vorzugsweise jeweils unabhängig -OH, -SH, -NH₂, -CH₃ oder -C₂H₅ darstellt.

In der Strukturformel (I) steht Z für ein Pyrimidin-Nukleotid oder ein
20 Pyrimidin-Nukleotidanalogen, z.B. ein Thymidin- oder/und Cytidin-Nukleotid bzw. Nukleotidanalogen. Vorzugsweise steht Z für ein Thymidin-Nukleotid, so dass $(Z)_n$ und $(Z)_m$ vorzugsweise jeweils mindestens ein Thymidin-Nukleotid enthalten. Besonders bevorzugt bedeutet Z jeweils ein Thymidin-2'-Desoxynukleotid. Grundsätzlich kann Z jedoch auch eine
25 Nukleotidanalogen-Einheit, wie zuvor beschrieben, darstellen.

Die Fluoreszenz-Markierungsgruppen der Sonde (I) sind vorzugsweise jeweils unabhängig ausgewählt aus Rhodaminen, Fluoresceinen, Oxazinen, Cyaninen, Bodipy Farbstoffen, Alexa-Farbstoffen etc. Besonders bevorzugt
30 sind Oxazine gemäß PCT/EP03/02981. Besonders bevorzugt sind M und M' grüne Fluoreszenz-Markierungsgruppen, wie etwa Rhodamingrün, Tetramethylrhodamin, Rhodamin 6G, Oregon grün, Bodipy 493, Alexa 488,

- 5 -

deren Quantenausbeute bei üblichen Sondenkonstrukten durch Elektronentransfer-Prozesse gequencht wird.

Die Fluoreszenz-Markierungsgruppen M und M' sind vorzugsweise gleich.
5 In bestimmten Ausführungsformen können M und M' jedoch auch verschieden sein. In diesem Fall unterscheiden sich M und M' vorzugsweise in mindestens einem Messparameter, z.B. Emissionswellenlänge oder/und Abklingzeit, so dass ein separater Nachweis von M und M' möglich ist.

10 Bei den Sonden (I) ist die Länge der Spacer n und n' jeweils unabhängig eine ganze Zahl von 1-15, vorzugsweise eine ganze Zahl von 3-10, besonders bevorzugt etwa 5.

Die Länge m der mit den Analyten bindenden Sondensequenz wird
15 günstigerweise so gewählt, dass unter den herrschenden Testbedingungen eine spezifische und nachweisbare Bindung des Analyten möglich ist. Üblicherweise stellt m eine ganze Zahl von 10-90, vorzugsweise von 12-50 dar.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer oder mehrerer Sonden der Strukturformel (I) in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, z.B. einer Nukleinsäure, in einer Probe, wobei das Verfahren den Nachweis einer Bindung von einer oder mehreren Sonden an den Analyten umfasst. Vorzugsweise umfasst das Verfahren den Nachweis
25 einer Hybridisierung von einer oder mehreren Sonden mit einer Zielnukleinsäure. Gegebenenfalls kann das Verfahren einen quantitativen Nachweis hinsichtlich der Anzahl der Hybridisierungsprodukte in der Probe oder/und der Größe der Hybridisierungsprodukte umfassen. Es sind jedoch auch andere Nachweisverfahren möglich, z.B. Nachweis der Bindung von
30 einer oder mehreren Sonden an ein Protein, wie etwa der Bindung von Aptameren an Proteine.

Die hervorragende Sensitivität der erfindungsgemäßen Nachweissonden erlaubt deren Einsatz auch bei sehr geringen Analytkonzentrationen. So wird bei Verwendung der erfindungsgemäßen Sonden eine ausreichende Nachweissensitivität selbst dann erzielt, wenn die Konzentration des nachzuweisenden Analyten $\leq 10^{-9}$ M in der Probe beträgt. Vorzugsweise beträgt die Konzentration des nachzuweisenden Analyten 10^{-10} bis 10^{-15} M. Die hohe Sensitivität der erfindungsgemäßen Sonden erlaubt einen Nachweis bei derart geringen Konzentrationen auch ohne vorhergehende Amplifikation des Analyten in der Probe.

10

Der nachzuweisende Analyt ist vorzugsweise eine Nukleinsäure, z.B. DNA oder RNA beliebiger Herkunft, die beispielsweise aus Prokaryonten, insbesondere pathogenen Prokaryonten, Archea oder Eukaryonten, insbesondere Säugern, wie etwa dem Menschen, stammen kann. Besonders bevorzugt stammt die nachzuweisende Nukleinsäure aus einer humanen Probe, z.B. einer Körperflüssigkeit, einer Gewebeprobe etc.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der nachzuweisenden Nukleinsäure um eine RNA aus einer biologischen Probe oder eine daraus synthetisierte nicht-amplifizierte cDNA. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der nachzuweisenden Nukleinsäure um eine nicht-amplifizierte genomische DNA.

20

Der Nachweis der Fluoreszenz der erfindungsgemäßen Sonden kann mit einer beliebigen Messmethode, z.B. mit einer orts- oder/und zeitaufgelösten Fluoreszenz-Spektroskopie erfolgen. Bevorzugt wird eine Messmethode verwendet, die in der Lage ist, in einem sehr kleinen Volumenelement, Fluoreszenzsignale bis hinunter zu Einzelphotonenzählung zu erfassen.

25

Beispielsweise kann die Detektion mittels konfokaler Einzelmoleküldetektion, wie etwa durch Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie erfolgen, wobei ein sehr kleines, vorzugsweise

30

- 7 -

ein konfokales Volumenelement, beispielsweise $0,1 \times 10^{-15}$ bis 20×10^{12} l der Probenflüssigkeit, dem Anregungslicht eines Lasers ausgesetzt wird, das die in diesem Messvolumen befindlichen Fluoreszenzmarkierungen zur Emission von Fluoreszenzstrahlung anregt, wobei die emittierte
5 Fluoreszenzstrahlung aus dem Messvolumen mittels eines Photodetektors gemessen wird, und eine Korrelation zwischen der zeitlichen Veränderung der gemessenen Emission und der relativen Beweglichkeit der beteiligten Moleküle erstellt werden kann, so dass bei entsprechend starker Verdünnung einzelne Moleküle in dem Messvolumen identifiziert werden
10 können.

Auf Einzelheiten zur Verfahrensdurchführung und apparative Details zu den für die Detektion verwendeten Vorrichtungen wird auf die Offenbarung des europäischen Patentes O 679 251 verwiesen. Die konfokale
15 Einzelmolekülbestimmung ist weiterhin bei Rigler und Mets (Soc. Photo-Opt.Instrum.Eng. 1921 (1993), 239 ff.) und Mets und Rigler (J. Fluoresc. 4 (1994), 259-264) beschrieben.

Alternativ bzw. zusätzlich kann die Detektion auch durch eine
20 zeitaufgelöste Abklingmessung, ein sogenanntes Time Gating erfolgen, wie beispielsweise von Rigler et al., "Picosecond Single Photon Fluorescence Spectroscopy of Nucleic Acids", in: "Ultrafast Phenomena", D.H. Auston, Ed., Springer 1984, beschrieben. Dabei erfolgt die Anregung der Fluoreszenzmoleküle innerhalb eines Messvolumens und anschließend -
25 vorzugsweise in einem zeitlichen Abstand von ≥ 100 ps - das Öffnen eines Detektionsintervalls am Fotodetektor. Auf diese Weise können durch Raman-Effekte erzeugte Hintergrundsignale ausreichend gering gehalten werden, um eine im Wesentlichen störungsfreie Detektion zu ermöglichen.

30 Besonders bevorzugte Detektionsverfahren und -vorrichtungen sind z.B. in PCT/EP01/07190, PCT/EP01/05408, PCT/EP01/05410, PCT/EP01/05409,

- 8 -

PCT/EP01/13120, PCT/EP02/02582, PCT/EP02/05866, PCT/EP02/13390, PCT/EP02/09610 und PCT/EP03/02713 beschrieben.

5 Besonders bevorzugt erfolgt die Verfahrensdurchführung derart, dass man mehrere Fluoreszenz-markierte Sonden, wobei es sich mindestens bei einer Sonde um eine erfindungsgemäße Sonde handelt, mit jeweils verschiedener Sequenz und verschiedenen Markierungsgruppen zum Nachweis eines einzigen Analyten verwendet. In diesem Fall wird das Vorhandensein des Analyten in der Probe vorzugsweise durch Vorhandensein einer Korrelation
10 zwischen dem Auftreten verschiedener Sonden entsprechend der gleichzeitigen Bindung an den Analyten bestimmt. Vorzugsweise wird ein solches Verfahren als Kreuzkorrelationsbestimmung durchgeführt, wie z.B. bei Schwille et al. (Biophys. J. 72 (1997), 1878-1886) und Rigler et al. (J. Biotechnol. 63 (1998), 97-109) beschrieben. Andere bevorzugte
15 Nachweismethoden umfassen die Koinzidenz-Analyse, die Principle Component-Analyse (PCA), die Fluoreszenzintensitäts-Distributionsanalyse (FIDA) und die Fluoreszenzintensitäts-Multiple-Distributionsanalyse (FIMDA).

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine Sondenkombination verwendet, die eine erfindungsgemäße doppelt markierte Sonde, die grüne Fluoreszenz-Markierungsgruppen trägt, zusammen mit einer Sonde, die eine oder mehrere rote Fluoreszenz-Markierungsgruppen trägt, beinhaltet.

25 Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend das Inkontaktbringen der Probe mit einer oder mehreren erfindungsgemäßen Sonden unter Bedingungen, bei denen eine Bindung der einen oder mehreren Sonden an den
30 nachzuweisenden Analyten erfolgen kann, und Bestimmen, ob eine Bindung stattfindet oder nicht.

- 9 -

Vorzugsweise ist der Analyt eine Nukleinsäure und der Nachweis umfasst eine Hybridisierung der einen oder mehreren Sonden mit der nachzuweisenden Nukleinsäure. Besonders bevorzugt wird die nachzuweisende Nukleinsäure vor dem Inkontaktbringen mit der oder den Sonden nicht einer Amplifikation, z.B. einer PCR, unterzogen.

Weiterhin soll die Erfindung durch das nachfolgende Beispiel erläutert werden.

Beispiel: Verwendung von Bi-fluorophor-markierten Oligonukleotiden

Im Folgenden wird die hervorragende Sensitivität der Nachweissonden verdeutlicht. Es werden zwei unterschiedliche grüne Sonden mit identischer Sequenz verwendet. Im ersten Fall handelt es sich um eine 5'-Rhodamingrün einfach markierte Sonde, im anderen Fall um eine erfindungsgemäße 5'-3' Rhodamingrün doppelt markierte Sonde, die einen Thymidin-Spacer von jeweils 5 Nukleotiden Länge sowohl für den 3' als auch 5'-Farbstoff beinhaltet. Die Sequenz der Nachweissonde ist spezifisch für die PGK-1-Sequenz (Accession-Number: V00572). Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze werden jeweils eine grüne markierte Sonde und eine rote markierte Sonde (ebenfalls PGK-1 spezifisch) in Lösung gleichzeitig an ein PGK-1-spezifisches cDNA-Fragment (Länge: 969 nt) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt in 6 X SSC, 0,06 % NP40 Puffer bei 60 °C über einen Zeitraum von 8 Stunden. Dabei werden unterschiedliche Konzentrationen des PGK-1 Fragments (0,0 nM PGK-1 bis 2 nM PGK-1) verwendet. Die Hybridisierungsprodukte werden mittels Kreuzkorrelationsspektroskopie analysiert.

Das Ergebnis dieser Analyse ist in den Figuren 1 und 2 gezeigt. In Figur 1 (Vergleichsbeispiel) wird die Kombination einer 5'-einfach markierten grünen Sonde und einer 5'-einfach markierten roten Sonde zum Nachweis

- 10 -

von PGK-1 cDNA in Konzentrationen von 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,2 nM und 0 nM untersucht.

5 In Figur 2 (Erfindungsbeispiel) wird die Kombination einer erfindungsgemäßen 5'3'-doppelt markierten grünen Sonde mit Thymidinspacer und einer 5'-einfach markierten roten Sonde zum Nachweis von PGK-1 cDNA in Konzentrationen von 0,05 nM, 0,03 nM, 0,02 nM, 0,01 nM, 0,005 nM und 0 nM untersucht.

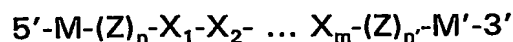
10 Die Sondenkonzentration in Figur 1 ist 2,0 nM und in Figur 2 0,1 nM.

Ein Vergleich der Figuren 1 und 2 zeigt eindrucksvoll die Vorteile der erfindungsgemäßen Nachweissonden. Während die untere Nachweisgrenze der einfach markierten Sonde bei 0,2 nM PGK-1 liegt (Figur 1), kann bei 15 Verwendung der doppelt markierten sonde die Sensitivität deutlich auf 5 nM PGK-1 erhöht werden (Figur 2).

Ansprüche

1. Sonde der allgemeinen Strukturformel (I)

5



10

worin X_1 , $X_2 \dots$ und X_m jeweils für ein beliebiges Nukleotid oder Nukleotidanalogen stehen und worin die Sequenz $X_1-X_2- \dots X_m$ für eine mit einem Analyten bindefähige Sondensequenz steht, Z jeweils unabhängig für ein Pyrimidin-Nukleotid oder -Nukleotidanalogen steht, M und M' Fluoreszenzmarkierungsgruppen darstellen, n und n' jeweils unabhängig ganze Zahlen von 1 bis 15 darstellen und m eine ganze Zahl entsprechend der Länge der Sondensequenz darstellt.

15

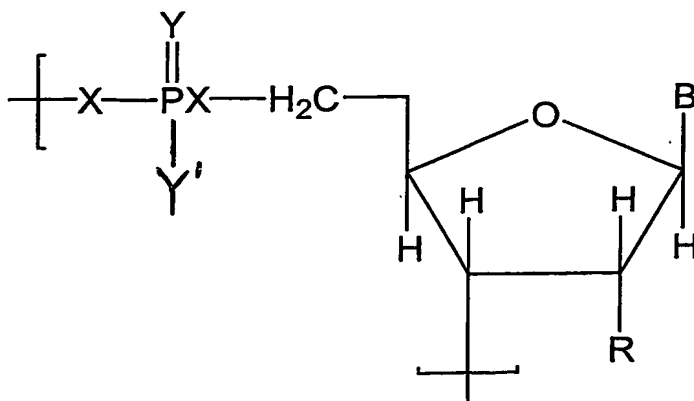
2. Sonde nach Anspruch 1,

20

dadurch gekennzeichnet,
dass X_1 , $X_2 \dots$ und X_m jeweils unabhängig ausgewählt sind aus Einheiten der allgemeinen Strukturformel (II) oder Salzen davon:

25

30



- 12 -

worin

B eine natürliche oder nicht-natürliche Nukleobase darstellt,

R einen Rest, ausgewählt aus H, OH, Halogen, -CN, -C₁-C₆-Alkyl,
-C₂-C₆-Alkenyl, -C₂-C₆-Alkynyl, -O-C₁-C₆-Alkyl, -O-C₂-C₆-Alkenyl, -O-
5 C₂-C₆-Alkynyl, -SH, -S-C₁-C₆-Alkyl, -NH₂, -NH(C₁-C₆-Alkyl) und -N(C₁-
C₆-Alkyl)₂, darstellt,

-X jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus -O-, -S-, -NR'-
und -CR'₂- darstellt,

-Y jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus =O und =S,
10 darstellt und

-Y' jeweils unabhängig einen Rest, ausgewählt aus -OR', -SR',
-(NR')₂ und -CH(R')₂ darstellt,

wobei R' jeweils unabhängig für H oder C₁-C₃-Alkyl steht.

- 15 3. Sonde nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass X₁, X₂ ... und X_m 2'-Desoxynukleotide sind.
- 20 4. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass Z aus Thymidin- oder/und Cytidin-Nukleotiden oder -
Nukleotidanaloga ausgewählt ist.
- 25 5. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass mindestens ein Z für ein Thymidin-Nukleotid oder -
Nukleotidanalogen steht.
- 30 6. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass Z jeweils ein Thymidin-2'-Desoxynukleotid ist.

- 13 -

7. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' jeweils unabhängig ausgewählt sind aus
Rhodaminen, Fluoresceinen, Oxazinen, Cyaninen, Bodipy-Farbstoffen
und Alexa-Farbstoffen.
8. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' aus grünen Fluoreszenz-Markierungsgruppen
ausgewählt sind.
9. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' gleich sind.
10. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass M und M' verschieden sind.
11. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass n und n' jeweils unabhängig ganze Zahlen von 3 bis 10
darstellen.
12. Sonde nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass m eine ganze Zahl von 10-90, vorzugsweise von 12-50,
darstellt.
13. Verwendung einer oder mehrerer Sonden nach einem der Ansprüche
1 bis 12 in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer
Probe.

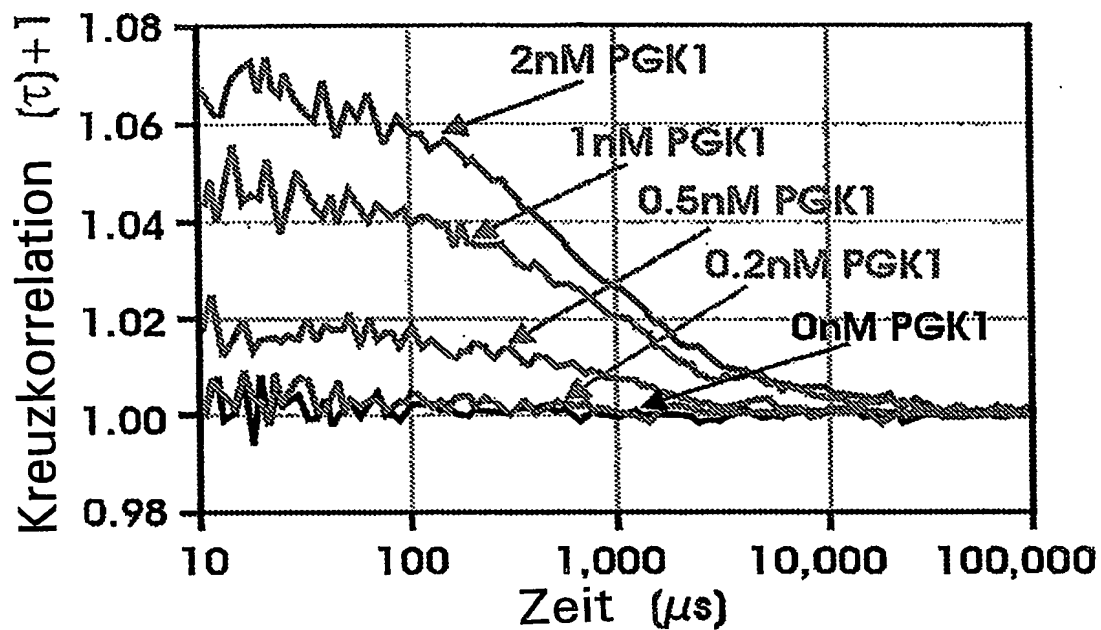
- 14 -

14. Verwendung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Konzentration des nachzuweisenden Analyten $\leq 10^{-9}$ M in
der Probe beträgt.
- 5 15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Analyt eine Nukleinsäure ist.
- 10 16. Verwendung nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die nachzuweisende Nukleinsäure eine RNA aus einer
biologischen Probe oder eine daraus synthetisierte nicht-amplifizierte
cDNA ist.
- 15 17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass die nachzuweisende Nukleinsäure eine nicht-amplifizierte
genomische DNA ist.
- 20 18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17 in der
Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS).
- 25 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass man mehrere Sonden mit jeweils verschiedener Sequenz und
verschiedenen Markierungsgruppen zum Nachweis eines einzigen
Analyten einsetzt.
- 30 20. Verwendung nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Nachweis eine Kreuzkorrelationsbestimmung umfasst.

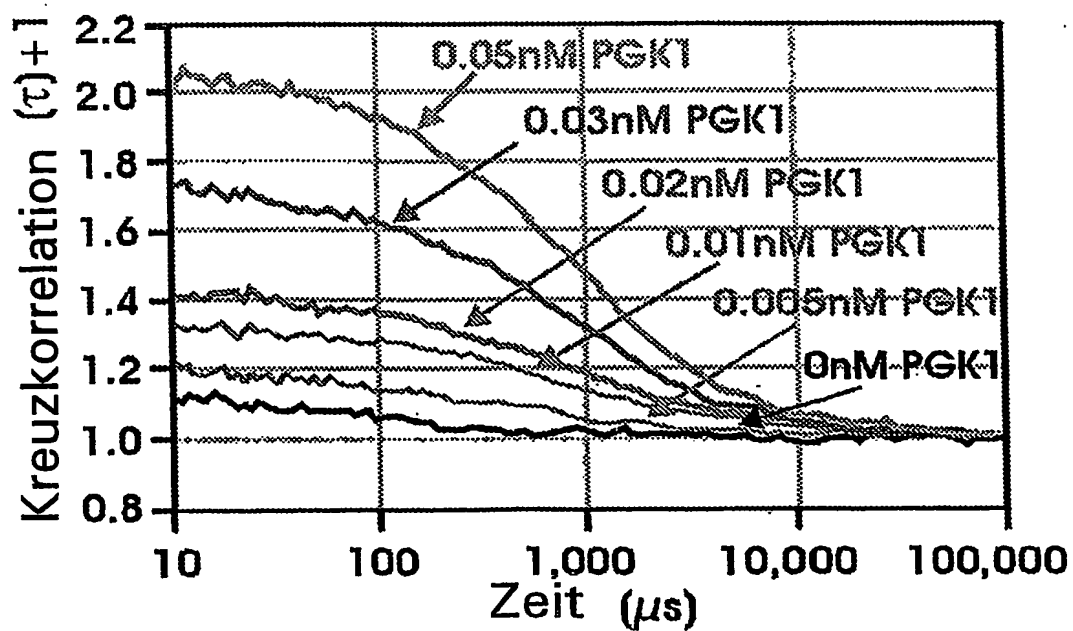
21. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend das Inkontaktbringen der Probe mit einer oder mehreren Sonden nach einem der Ansprüche 1 bis 12 unter Bedingungen, bei denen eine Bindung der einen oder mehreren Sonden an den nachzuweisenden Analyten erfolgen kann, und Bestimmen, ob eine Bindung stattfindet oder nicht.
22. Verwendung nach Anspruch 21, umfassend den Nachweis einer Nukleinsäure durch Hybridisierung.
23. Verfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet,** dass die nachzuweisende Nukleinsäure vor dem Inkontaktbringen nicht amplifiziert wird.

- 1/1 -

Figur 1



Figur 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUDERT W.A. ET AL.: "Double-labeled fluorescent probes for 5'nuclease assays: Purification and performance evaluation" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, US, vol. 22, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 1140-1145, XP002113136 ISSN: 0736-6205 abstract; figures 3,5	1-8, 10-13, 15-17, 21-23
X	TYAGI S. ET AL.: "MOLECULAR BEACONS: PROBES THAT FLUORESCCE UPON HYBRIDIZATION" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 14, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 303-308, XP000196024 ISSN: 1087-0156 the whole document	1-8, 10-13, 15,16, 18-22
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 2004

Date of mailing of the international search report

19/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Barz, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006180

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIDENKO V.V.: "DNA PROBES USING FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET): DESIGNS AND APPLICATIONS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, US, vol. 31, no. 5, November 2001 (2001-11), pages 1106-1121, XP001082961 ISSN: 0736-6205 abstract; figures 1,2 page 1108 - page 1110	1-23
X	BAGWELL C.B. ET AL.: "A NEW HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM FOR SPECIFIC NUCLEIC ACID SEQUENCES: POLY-DA AND POLY-A DETECTION" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 12, 1994, pages 2424-2425, XP001146995 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-23
X	PARKHURST K.M. ET AL.: "KINETIC STUDIES OF FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER EMPLOYING A DOUBLE-LABELED OLIGONUCLEOTIDE: HYBRIDIZATION TO THE OLIGONUCLEOTIDE COMPLEMENT AND TO SINGLE-STRANDED DNA" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 34, no. 1, January 1995 (1995-01), pages 285-292, XP002937506 ISSN: 0006-2960 page 285, left-hand column; figure 1	1-8, 10-13, 15,16, 18-22
X	US 2001/016323 A1 (PARKHURST L.J. ET AL.) 23 August 2001 (2001-08-23) abstract; claims 1-8; figure 1	1-8, 10-13, 15,16, 18-22
A	OKAMURA Y. ET AL.: "Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, no. 24, 15 December 2000 (2000-12-15), page E107, XP002215063 ISSN: 0305-1048 abstract; figure 3	1-23
P,A	WINTER H. ET AL.: "Direct gene expression analysis" CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, vol. 5, no. 2, April 2004 (2004-04), pages 191-197, XP001184007 ISSN: 1389-2010 abstract; figure 1	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006180

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001016323 A1	23-08-2001	US 6248518 B1	19-06-2001
		AU 5152798 A	22-05-1998
		DE 19782089 T0	23-12-1999
		GB 2333597 A ,B	28-07-1999
		WO 9818965 A1	07-05-1998
<hr/>			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006180

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RUDERT W.A. ET AL.: "Double-labeled fluorescent probes for 5'nuclease assays: Purification and performance evaluation" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, US, Bd. 22, Nr. 6, Juni 1997 (1997-06), Seiten 1140-1145, XP002113136 ISSN: 0736-6205 Zusammenfassung; Abbildungen 3,5	1-8, 10-13, 15-17, 21-23
X	TYAGI S. ET AL.: "MOLECULAR BEACONS: PROBES THAT FLUORESCCE UPON HYBRIDIZATION" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 14, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 303-308, XP000196024 ISSN: 1087-0156 das ganze Dokument	1-8, 10-13, 15,16, 18-22
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Oktober 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/10/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Barz, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DIDENKO V.V.: "DNA PROBES USING FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET): DESIGNS AND APPLICATIONS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, US, Bd. 31, Nr. 5, November 2001 (2001-11), Seiten 1106-1121, XP001082961 ISSN: 0736-6205 Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 Seite 1108 - Seite 1110	1-23
X	BAGWELL C.B. ET AL.: "A NEW HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM FOR SPECIFIC NUCLEIC ACID SEQUENCES: POLY-DA AND POLY-A DETECTION" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 22, Nr. 12, 1994, Seiten 2424-2425, XP001146995 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	1-23
X	PARKHURST K.M. ET AL.: "KINETIC STUDIES OF FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER EMPLOYING A DOUBLE-LABELED OLIGONUCLEOTIDE: HYBRIDIZATION TO THE OLIGONUCLEOTIDE COMPLEMENT AND TO SINGLE-STRANDED DNA" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 34, Nr. 1, Januar 1995 (1995-01), Seiten 285-292, XP002937506 ISSN: 0006-2960 Seite 285, linke Spalte; Abbildung 1	1-8, 10-13, 15,16, 18-22
X	US 2001/016323 A1 (PARKHURST L.J. ET AL.) 23. August 2001 (2001-08-23) Zusammenfassung; Ansprüche 1-8; Abbildung 1	1-8, 10-13, 15,16, 18-22
A	OKAMURA Y. ET AL.: "Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 28, Nr. 24, 15. Dezember 2000 (2000-12-15), Seite E107, XP002215063 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung; Abbildung 3	1-23
P,A	WINTER H. ET AL.: "Direct gene expression analysis" CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY, Bd. 5, Nr. 2, April 2004 (2004-04), Seiten 191-197, XP001184007 ISSN: 1389-2010 Zusammenfassung; Abbildung 1	1-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006180

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2001016323 A1	23-08-2001	US 6248518 B1	19-06-2001
		AU 5152798 A	22-05-1998
		DE 19782089 T0	23-12-1999
		GB 2333597 A ,B	28-07-1999
		WO 9818965 A1	07-05-1998
<hr/>			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.